

## 明 細 書

### ヒトFlt3の機能を抑制するための組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、ヒトFlt3の機能を抑制するための組成物、該組成物を用いたアポトーシス誘発方法、該方法のためのキットに関する。

### 背景技術

[0002] 白血病の遺伝子治療は、長年にわたって研究されている(例えば、非特許文献1又は2参照)。そして、現実には臨床研究も開始されている(例えば、非特許文献3又は4参照)。さらに、アンチセンス技術やリボザイム技術を用いたRNAベースの治療技術も開発されつつある(例えば、非特許文献5参照)。

[0003] 一方、1998年に報告された線虫におけるRNA干渉(RNA interference、RNA i)は、二本鎖RNAによって配列特異的なmRNA分解が生じることによる遺伝子発現の抑制現象として注目されている(例えば、非特許文献6参照)。前記RNA干渉は、長鎖2本鎖RNAが、Dicerと呼ばれるRNaseIIIタイプの活性によりsiRNA(short interfering RNA)と呼ばれる21〜25ヌクレオチドの短鎖RNAに分解され、続いて、該siRNAが、RISC(RNA-induced silencing complex)と呼ばれるリボ核酸タンパク質複合体に組み込まれ、標的RNAにATP依存的に結合し、標的RNAを分解するというメカニズムにより起こると考えられている(例えば、非特許文献7〜12参照)。その後、哺乳動物細胞でもRNA干渉を応用して遺伝子発現を抑制することが可能であることが報告されており(例えば、非特許文献13又は14参照)、白血病に特有なBCR-ABLやAML1-MTG8といったキメラmRNAの発現を抑制するRNA干渉剤が報告されている(例えば、非特許文献15又は16参照)。

[0004] 一方、白血病細胞では、AML(急性骨髄性白血病、acute myeloid leukemia)、ALL(急性リンパ性白血病、acute lymphocytic leukemia)、CML(慢性骨髄性白血病、chronic myeloid leukemia)等の70〜100%で正常骨髄細胞に比べ1000〜10000倍というFlt3の高発現が観察されることが報告されている(例えば、非特許文献17参照)。さらに、Flt3の膜貫通部直下をコードする膜近傍領域に

縦列重複変異(Flt3/ITD変異、ITD:internal tandem duplication)が発見され、AMLの20～30%、APL(急性前骨髄球性白血病、acute promyelocytic leukemia、現在のFAB分類においてはAML:M3と称する)の20%、MDS(骨髄異形成症候群、myelodysplastic syndrome)の5%に検出され、病態や予後不良の独立した因子である可能性が示唆されている(例えば、特許文献1又は非特許文献18～21参照)。Flt3/ITD変異が存在する場合はリガンド非依存性のキナーゼ活性化がおこっている。かかるFlt3のキナーゼ活性を阻害する低分子化合物として、例えば、CEP-701(例えば、非特許文献22参照)、SU11248(例えば、非特許文献23参照)、SU5416(例えば、非特許文献24参照)、AG1295(例えば、非特許文献25参照)等が研究されているが、医薬品として有効な化合物は未だ得られていないのが現状である。

特許文献1:国際公開第00/11470号パンフレット

非特許文献1:Holt J. T.、他2名、Molecular Cellular Biology、第8巻、第2号、963～973頁(1988年)

非特許文献2:Bettinger T.、Read M. L.、Current Opinion in Molecular Therapeutics、第3巻、第8号、116～124頁(2001年)

非特許文献3:Verzeletti S.、他6名、Human Gene Therapy、第9巻、第15号、2243～2251頁(1998年)

非特許文献4:Wierda W. G.、Kipps T. J.、Seminars in Oncology、第27巻、第5号、502～511頁(2000年)

非特許文献5:Gewirtz A. M.、他2名、Blood、第92巻、第3号、712～736頁(1998年)

非特許文献6:Fire A.、他5名、Nature、第391巻、第806～811頁(1998年)

非特許文献7:Bernstein E.、他3名、Nature、第409巻、第6818号、363～366頁(2001年)

非特許文献8:Tuschlt.、他4名、Genes and Development、第13巻、第24号、3191～3197頁(1999年)

非特許文献9:Zamore P. D.、他3名、Cell、第101巻、第1号、25～33頁(2000年)

0年)

非特許文献10:Nykanen A.、他2名、Cell、第107巻、第3号、309～321頁(2001年)

非特許文献11:Elbashir S. M.、他2名、Genes and Development、第15巻、第2号、188～200頁(2001年)

非特許文献12:Lipardi C.、他2名、Cell、第107巻、第3号、297～307頁(2001年)

非特許文献13:Elbashir S. M.、他5名、Nature、第411巻、第6836号、第494～498頁(2001年)

非特許文献14:Caplen N. J.、他4名、Proc Natl Acad Sci USA、第98巻、第17号、9742～9747頁(2001年)

非特許文献15:Wilda M.、他3名、Oncogene、第21巻、37号、5716～5724頁(2002年)

非特許文献16:Heidenreich O.、他7名、Blood、第101巻、第8号、3157～3163頁(2003年)

非特許文献17:Drexler H. G.、Leukemia、第10巻、第4号、588～599頁(1996年)

非特許文献18:Nakao M.、他8名、Leukemia、第10巻、第21号、1911～1918頁(1996年)

非特許文献19:Yokota S.、他10名、Leukemia、第11巻、第10号、1605～1609頁(1997年)

非特許文献20:Kiyoi H.、他19名、Leukemia、第11巻、9号、1447～1452頁(1997年)

非特許文献21:Gilliland D. G.、Griffin J. D.、Blood、第100巻、第5号、1532～1542頁(2002年)

非特許文献22:Levis M.、他9名、Blood、第99巻、第11号、3885～3891頁(2002年)

非特許文献23:O'Farrell A. M.、他14名、Blood、第101巻、第9号、3597～

3605頁(2003年)

非特許文献24: Giles F. J.、他16名、Blood、第102巻、第3号、795〜801頁(2003年)

非特許文献25: Levis M.、他4名、Blood、第98巻、第3号、885〜887頁(2001年)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の1つの側面は、Flt3の機能を抑制すること、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を抑制すること、前記細胞の増殖を優先的に抑制すること、Flt3遺伝子の発現量を抑制すること、Flt3をコードする核酸の変異に基づく事象を抑制すること、Flt3由来増殖シグナルを抑制すること、Flt3タンパク質発現量を抑制すること等の少なくとも1つを達成しうる、組成物を提供することにある。
- [0006] また、本発明の他の側面は、前記組成物による効果を発揮させること、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに、例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞において、前記組成物中のFlt3の機能を抑制しうる核酸を発現させること、前記細胞において、Flt3遺伝子の発現量を抑制すること、Flt3をコードする核酸の変異に基づく事象を抑制すること、Flt3由来増殖シグナルを抑制すること、Flt3タンパク質発現量を抑制すること等の少なくとも1つを達成しうる、組成物を提供することにある。
- [0007] また、本発明のさらに他の側面は、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を抑制すること、前記細胞の増殖を優先的に抑制すること、前記細胞のアポトーシスを誘発させること、前記細胞のFlt3由来増殖シグナルを抑制すること、前記細胞のFlt3タンパク質発現量を抑制すること、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制

すること等の少なくとも1つを達成しうる、アポトーシス誘発方法を提供することにある。

[0008] さらに、本発明の別の側面は、前記アポトーシス誘発方法を効率よく行なうこと、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を抑制すること、前記細胞の増殖を優先的に抑制すること、前記細胞のアポトーシスを誘発させること、前記細胞のFlt3由来増殖シグナルを抑制すること、前記細胞のFlt3タンパク質発現量を抑制すること、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制すること等の少なくとも1つを達成しうる、前記方法のための組成物及びキットを提供することにある。なお、本発明の他の概念、目的等は、本明細書の記載からも明らかである。

#### 課題を解決するための手段

[0009] すなわち、本発明は、第1の側面では、ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を含有した組成物に関する。

[0010] 本発明は、第2の側面では、下記(a)～(c)：

(a)配列番号：27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

(b)配列番号：28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び

(c)配列番号：29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を含有してなる、組成物に関する。本発明の組成物においては、好ましくは、15～25塩基の鎖長を有する核酸であることが望ましい。特に限定されないが、例えば、配列番号：1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応するRNA配列を含有するもの等が挙げられる。さらに、本発明の組成物としては、例えば、配列番号：2の塩基配列を有する核酸と配列番号：3の塩基配列を有する核酸との組み合わせ、配列番号：5の塩基配列を有する核酸と配列番号：6の

塩基配列を有する核酸との組み合わせ、配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸との組み合わせ、配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸との組み合わせ、配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸との組み合わせ、及び配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸との組み合わせ、を含有するもの等が挙げられる。

[0011] 本発明は、第3の側面では、ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有した組成物に関する。

[0012] 本発明は、第4の側面では、下記(a)～(c)：

(a)配列番号:27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

(b)配列番号:28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び

(c)配列番号:29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

からなる群より選択された領域を標的とし、かつ哺乳動物細胞内でFlt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、組成物に関する。本発明の組成物中のベクターにおいて、プロモーターとして、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター等のプロモーターを含有していてもよい。また、該ベクターにおいては、特に限定されないが、例えば、前記プロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーター、CMVプロモーター等であることが望ましい。さらに、該ベクターには、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター及びレトロウイルスベクターから選択されたベクターを基本骨格として好適に使用できる。

[0013] 本発明は、第5の側面では、本発明の組成物により、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることを特徴とする、アポトーシス誘発方法に関する。本発明のアポトーシス誘発方法においては、キ

ナーゼを阻害する薬剤をさらに用いて、同時にあるいはいずれか一方の使用後に他方を使用し、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発してもよい。

[0014] 本発明の第1－第5の側面において、本発明の組成物は、前記アポトーシスを誘発を効率よく行なうこと、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を抑制すること、前記細胞の増殖を優先的に抑制すること、前記細胞のアポトーシスを誘発させること、前記細胞のFlt3由来増殖シグナルを抑制すること、前記細胞のFlt3タンパク質発現量を抑制すること、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制すること等のための組成物でもある。

[0015] 本発明は、第6の側面では、本発明の組成物を含有したキットに関する。かかるキットは、前記アポトーシスを誘発を効率よく行なうこと、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を抑制すること、前記細胞の増殖を優先的に抑制すること、前記細胞のアポトーシスを誘発させること、前記細胞のFlt3由来増殖シグナルを抑制すること、前記細胞のFlt3タンパク質発現量を抑制すること、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制すること等のためのキットとしても用いる。

[0016] すなわち、本発明の要旨は、

[1] ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を含有してなる、組成物、

[2] 下記(a)－(c)：

(a) 配列番号：27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

(b) 配列番号：28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び

(c) 配列番号：29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に

対応する領域、

からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を含有してなる、組成物、

[3] 15ー25塩基の鎖長を有する核酸を含有してなる、前記[1]又は[2]記載の組成物、

[4] 配列番号:1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応するRNA配列を含有してなる、前記[1]又は[2]記載の組成物、

[5] 配列番号:2の塩基配列を有する核酸と配列番号:3の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:5の塩基配列を有する核酸と配列番号:6の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、及び

配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

からなる群より選択された核酸を含有してなる、前記[1]ー[4]のいずれか1項に記載の組成物、

[6] ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、組成物、

[7] 下記(a)ー(c):

(a)配列番号:27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

(b)配列番号:28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応

する領域、及び

(c) 配列番号:29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

からなる群より選択された領域を標的とし、かつ哺乳動物細胞内でFlt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、組成物、

[8] 該核酸が、標的領域の15〜25塩基の塩基配列を有する、前記[6]又は[7]記載の組成物、

[9] 配列番号:1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応し、かつ該塩基配列に対応するRNAを発現しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、前記[6]又は[7]記載の組成物、

[10] 該核酸が、配列番号:2の塩基配列を有する核酸と配列番号:3の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:5の塩基配列を有する核酸と配列番号:6の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、及び

配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

からなる群より選ばれた核酸を保持したベクターを含有してなる、前記[6]〜[9]のいずれか1項に記載の組成物、

[11] プロモーターとして、RNAポリメラーゼIIIプロモーター又はRNAポリメラーゼIプロモーターを有するベクターを含有してなる、前記[6]〜[10]のいずれか1項に記載の組成物、

[12] 該プロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーター

及びCMVプロモーターからなる群より選択されたプロモーターである、前記[11]記載の組成物、

[13] アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター及びレトロウイルスベクターから選択されたベクターを基本骨格として含有してなる、前記[6]～[12]のいずれか1項に記載の組成物、

[14] 前記[1]～[13]のいずれか1項に記載の組成物により、FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることを特徴とする、アポトーシス誘発方法、

[15] キナーゼを阻害する薬剤をさらに用いて、同時にあるいはいずれか一方の使用後に他方を使用し、FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることを特徴とする、前記[14]記載の方法、並びに

[16] 前記[1]～[13]のいずれか1項に記載の組成物を含有してなる、前記[14]又は[15]記載の方法を行なうためのキット、に関する。

## 発明の効果

[0017] 本発明により、従来のアンチセンス技術やリボザイム技術とは異なる、Flt3の機能の抑制に使用できる組成物が提供される。本発明により、前記組成物として化学合成された核酸(例えば、siRNA)ならびにその誘導体を含有する組成物、又は当該核酸を細胞内で発現するように構築されたベクターを含有する組成物が提供される。また、本発明の組成物を利用したFlt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異を有する細胞で選択的に又は優先的にFlt3の機能を抑制する方法、例えば、アポトーシス誘発方法、該方法のためのキットが提供される。本発明の組成物によれば、Flt3の機能をダウンレギュレーションし、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに、例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞

の増殖を優先的に抑制し、前記細胞のアポトーシスを誘発させること、前記細胞のFlt3由来増殖シグナルを抑制すること、前記細胞のFlt3タンパク質発現量を抑制すること、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制すること、あるいはFlt3をコードする核酸の変異に基づく事象を抑制することができるという優れた効果を奏する。また、本発明の組成物によれば、前記Flt3の機能を抑制する効果を発揮させ、前記細胞において、Flt3の機能を抑制する核酸を発現させ、前記細胞において、例えば、RNA干渉を生じさせ、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制すること、Flt3をコードする核酸の変異に基づく事象を抑制することあるいはFlt3タンパク質発現量を抑制することができるという優れた効果を奏する。さらに、本発明のアポトーシス誘発方法によれば、前記細胞の増殖を優先的に抑制し、前記細胞のアポトーシスを誘発させることができるという優れた効果を奏する。また、本発明のキットによれば、前記アポトーシス誘発方法を効率よく行なうことができ、前記細胞の増殖を優先的に抑制し、前記細胞のアポトーシスを誘発させることができるという優れた効果を奏する。

#### 図面の簡単な説明

[0018] [図1]siRNA及びキナーゼ阻害剤の併用による、細胞増殖活性の変化に関する図である。

[図2]siRNA発現ベクターを用いた細胞増殖抑制に関する図である。

[図3]siRNA単独もしくはsiRNAカクテルの使用による、細胞増殖活性の変化に関する図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0019] 本発明は、Flt3(FMS-like tyrosine kinase 3)の機能をダウンレギュレートすることでFlt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞の増殖を優先的に抑制し、アポトーシスを誘発することができるという本発明者らの驚くべき知見に基づく。白血病の予後不良の要因であるFlt3の高発現やITD変異を有する患者の治療は、骨髄移植法に頼っており、白血病の約25%つまり全世界で年間数万人のFlt3異常を有する患者を救命できない状態にあるのが現状であり、したがって、本発明により、Flt3遺伝子の高発現及び／又はFlt3/ITD変異遺伝子の発現を阻害すること、あるいはFlt3タンパク質の発現を制御することにより、白血病細胞の増殖シグナル伝達

の大元を阻害することになり、白血病細胞の増殖を阻害することが期待される。

[0020] 前記Flt3は、造血細胞の増殖因子であるFL (Flt3リガンド) の受容体であり、KIT (幹細胞因子受容体)、M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) 及びPDGF (血小板由来増殖因子) を含むType III receptor tyrosine kinase (TRK) ファミリーに属する膜結合型チロシンキナーゼ受容体のひとつである。前記Flt3は、5つの細胞外イムノグロブリン様ドメインと1つの膜貫通ドメインとそれに続く膜近傍ドメインとTK1及びTK2という2つのサブドメインからなる細胞内キナーゼドメインとから構成される。前記Flt3にFLが結合することにより、受容体の2量体化と受容体キナーゼの活性化がおこり、細胞内へのシグナル伝達が開始される。

[0021] また、前記Flt3は、特に造血細胞の腫瘍化や増殖に関与する重要な分子と考えられる。Flt3遺伝子をノックアウトしたマウスは健康なマウスに成長するが、初期造血細胞の欠乏状態を示し、正常骨髓細胞ではCD117を強発現しているCD34+細胞に限定されて発現している。

[0022] (1) 本発明の組成物

本発明の1つの側面は、ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制する核酸を含有した組成物に関する。

[0023] 本発明の別の側面は、下記(a)〜(c)：

(a) 配列番号：27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

(b) 配列番号：28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び

(c) 配列番号：29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制する核酸を含有してなる、組成物に関する。

[0024] 本明細書において、「ヒトFlt3の膜近傍領域」とは、例えば、健常人の当該Flt3遺伝子のエキソン13〜14の領域をいう。前記領域は、本発明の組成物に含まれる核

酸(すなわち、Flt3の機能を抑制しうる核酸)の標的領域として好適である。また、当該「ヒトFlt3の膜近傍領域」は、「ヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域」を包含する。前記「ヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域」とは、配列番号:27の塩基配列で示されるヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列の領域に対応する領域をいい、例えば、特に限定されないが、前記配列番号:27において、塩基の付加、置換、欠失、挿入等を有する配列の領域も包含する。また、上記膜近傍領域を含むエクソン14〜15において、Flt3/ITD変異を有する配列の領域も、本発明の組成物に含まれる「Flt3の機能を抑制しうる核酸の標的領域」、すなわち、「ヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域」に含まれる。なお、ヒト正常型Flt3のアミノ酸配列及びcDNA配列については、例えば、ジーンバンクアクセッション番号:NM\_004119に開示された配列等が例示される。

[0025] 本明細書において、「ヒトFlt3のキナーゼ領域」とは、例えば、健常人の当該Flt3遺伝子のエクソン15〜エクソン19の領域をいう。前記領域は、本発明の組成物に含まれる核酸(すなわち、Flt3の機能を抑制しうる核酸)の標的領域として好適である。また、当該「ヒトFlt3のキナーゼ領域」は、「ヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域」を包含する。前記「ヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域」とは、配列番号:28の塩基配列で示されるヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列の領域に対応する領域をいい、例えば、特に限定されないが、配列番号:28において、塩基の付加、置換、欠失、挿入等を有する配列の領域も包含する。

[0026] 本明細書において、「ヒトFlt3のATP結合部位領域」とは、例えば、健常人の当該Flt3遺伝子のエクソン14〜エクソン19の領域をいう。前記領域は、本発明の組成物に含まれる核酸(すなわち、Flt3の機能を抑制しうる核酸)の標的領域として好適である。また、当該「ヒトFlt3のATP結合部位領域」は、「ヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域」をも包含する。前記「ヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域」とは、配列番号:29の塩基配列で示されるヒト正常型Flt3のATP結合領域のcDNA塩基配列の領域に対応する

領域をいい、例えば、特に限定されないが、配列番号:29において、塩基の付加、置換、欠失、挿入等を有する配列の領域も包含する。

[0027] 本発明の組成物は、ヒトFlt3の機能を抑制するための核酸を含有するものであって、前記ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域、又は前記(a)ー(c)からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的領域とすることに1つの大きな特徴がある。なお、前記標的領域は、1種の領域であっても、複数種の領域であってもよい。従って、本発明の組成物は、上記領域の塩基配列から任意に後述の実施例にそって構築することができる。また、本発明の組成物によれば、該RNA干渉剤が前記領域を標的としているものであるものであるため、Flt3の機能を効果的にダウンレギュレーションすることができるという優れた効果を発揮する。

[0028] 本明細書において、「Flt3の機能を抑制しうる」とは、特に限定されないが、Flt3遺伝子の発現、Flt3由来増殖シグナルの機能及び／又は発現あるいはFlt3タンパク質の発現を抑制しうることをいう。いいかえれば、例えば、かかる概念には、Flt3遺伝子の転写を抑制しうること、転写後のmRNAを不安定化しうること、Flt3 mRNAからの翻訳を抑制しうること、あるいは翻訳後のアミノ酸配列の機能を抑制しうることも含まれる。また、別の側面では、「Flt3の機能を抑制しうる」とは、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を抑制すること、前記細胞の増殖を優先的に抑制すること、前記細胞のアポトーシスを誘発させること、前記細胞のFlt3由来増殖シグナルを抑制すること、前記細胞のFlt3タンパク質発現量を抑制すること、前記細胞のFlt3遺伝子の発現量を抑制することであってもよい。上記「Flt3の機能を抑制しうる」核酸としては、特に限定されないが、siRNAが例示される。

[0029] 従って、本発明の組成物によれば、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有癌化細胞、さらに例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を優先的に抑制することができるという優れた効果を発揮する。さらに、別の側面では、本発明の組成物によれば、該組成物がヒトFlt3の膜近傍領域、キナ

一ゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域、又は前記(a)ー(c)の少なくとも1種の領域を標的としているものであるため、Flt3をコードする核酸の変異に基づく事象を抑制することができる。

[0030] 本明細書において、「Flt3高発現細胞」とは、Flt3 mRNAが高発現している細胞、Flt3由来増殖シグナルが増大している細胞、Flt3タンパク質が高発現している細胞等のいずれもが含まれる。また、前記「Flt3高発現癌化細胞」とは、Flt3 mRNAが高発現している癌化細胞、Flt3由来増殖シグナルが増大している癌化細胞、Flt3タンパク質が高発現している癌化細胞等のいずれもが含まれる。さらに、Flt3高発現白血病細胞とは、Flt3 mRNAが高発現している白血病細胞、Flt3由来増殖シグナルが増大している白血病細胞、Flt3タンパク質が高発現している白血病細胞等のいずれもが含まれる。

[0031] さらに、「Flt3/ITD変異含有細胞」とは、Flt3の膜近傍領域のエキソン14ー15の領域において健常人にはない縦列重複変異を有する細胞、すなわち、当該変異由来のmRNAが高発現している細胞、当該変異に起因してFlt3由来増殖シグナルが増大している細胞、当該変異Flt3タンパク質が高発現している細胞等のいずれもが含まれる。また、「Flt3/ITD変異含有癌化細胞」とは、Flt3の膜近傍領域のエキソン14ー15の領域において健常人にはない縦列重複変異を有する癌化細胞、すなわち、当該変異由来のmRNAが高発現している癌化細胞、当該変異に起因してFlt3由来増殖シグナルが増大している癌化細胞、当該変異Flt3タンパク質が高発現している癌化細胞等のいずれもが含まれる。さらに、「Flt3/ITD変異含有白血病細胞」とは、Flt3の膜近傍領域のエキソン14ー15の領域において健常人にはない縦列重複変異を有する白血病細胞、すなわち、当該変異由来のmRNAが高発現している白血病細胞、当該変異に起因してFlt3由来増殖シグナルが増大している白血病細胞、当該変異Flt3タンパク質が高発現している白血病細胞等のいずれもが含まれる。

[0032] 前記「Flt3をコードする核酸の変異に基づく事象」としては、例えば、造血器腫瘍、具体的には白血病、さらに具体的には急性骨髄性白血病(AML)、急性前骨髄性白血病(APL)、急性リンパ性白血病(ALL)、骨髄異形成症候群(MDS)等が挙げ

られる。

[0033] 本発明の組成物に含まれる「Flt3の機能を抑制しうる核酸」としては、特に限定されないが、RNA干渉用のsiRNAが例示され、当該siRNAの場合、哺乳動物細胞におけるインターフェロン応答抑制の観点から、例えば15ー29塩基の鎖長を有するもの、好ましくは15ー25塩基対の鎖長を有するもの、さらに好ましくは、20ー25塩基対の鎖長を有するものが例示される。また、前記鎖長の塩基配列の全てが標的領域の塩基配列であってもよく、その一部が標的領域の塩基配列であってもよい。さらに、本発明の組成物には、哺乳動物細胞におけるRNA干渉の有効性の観点から、例えば、3'末端側に2ー4塩基突出した二本鎖RNAの形状のものさらに好ましくは3'末端側に2塩基突出した二本鎖RNAの形状のものであっても良い。該に2ー4塩基としてはTT配列ーTTTT配列が例示される。

[0034] また、本発明の一態様として、健常人には見られないFlt3遺伝子の縦列重複変異の領域を標的とした核酸を含有する組成物であってもよい。当該「縦列重複変異」とは、Flt3遺伝子の膜近傍領域において、数十ヌクレオチドの塩基配列が縦列重複をおこす変異のことをいう。なお、前記縦列重複変異には、縦列重複の度合い、縦列重複する配列等について、各個体(症例)による多様性が生じている場合も含まれる。

[0035] すなわち、当該縦列重複変異を標的とする場合、上記個々の症例の縦列重複変異領域を含む塩基配列に対応する核酸を用いることができる。特に限定されないが、例えばRNA干渉のためのsiRNAであってもよい。当該縦列重複変異領域を用いることにより、Flt3遺伝子の縦列重複変異を有する細胞のみをRNA干渉させることができ、その結果としてFlt3の機能を抑制することができる。

[0036] 本発明の組成物によれば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、該細胞にアポトーシスを誘発させることができる。

[0037] 以下、本発明の組成物に含まれる「Flt3の機能を抑制しうる核酸」の設計方法について、RNA干渉用のsiRNAを例として説明する。当該siRNAの場合、(I)2次構造予測のステップ、及び(II)siRNA配列選定のステップにより設計されうる。

[0038] 前記(I)2次構造予測は、抑制すべき遺伝子の2次構造をプログラム等によって予

測することにより行なわれうる。RNA干渉を効率よく生じさせる観点から、強い2次構造をとる箇所は避けることが好ましい。前記2次構造予測プログラムとしては、特に限定は無いが、MFOLDプログラム(<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>)が使用できる。

[0039] 前記(II) siRNA配列選定においては、標的とする領域の配列、Flt3の機能を抑制しうる核酸の塩基配列に対応する領域の配列であればよく、特に限定されないが、例えば、プロモーター領域、構造遺伝子領域、5'非翻訳領域、3'非翻訳領域及び開始コドン周辺領域の塩基配列のいずれもが好適に使用できる。例えば、標的とする領域の配列を選定する場合、Flt3をコードする核酸における配列の開始コドンから75ヌクレオチド残基以上下流、より好ましくは、1687〜2347ヌクレオチド残基下流の領域において、2つの連続したアデニル酸残基、又は2つのアデニル酸残基と1つのグアニル酸残基とを、センス鎖とすることが望ましい。また、siRNA配列を作製する場合、2つの連続したアデニル酸残基以降の任意の13〜29ヌクレオチド残基とからなる配列、さらに好ましくは、1つのグアニル酸残基と任意の20ヌクレオチド残基とからなる配列又は1つのシチジル酸残基と任意の20ヌクレオチド残基とからなる配列であることが望ましい。センス鎖のGC含量は、特に限定されないが、30〜70%、より好ましくは40〜60%とすることができる。非特異的作用を防ぐため、好ましくは、設計段階で塩基配列相同性検索を行ない、標的配列に特異的であること、すなわち、既知配列のデータベース中の配列に対する配列同一性が低く、標的配列に対して特異的である配列を確認することが望ましい。

[0040] 本発明の組成物に含有される核酸は、特に限定されないが、哺乳動物細胞において発現したFlt3の機能を抑制しうる配列の観点から、例えば、配列番号:1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応するRNA配列を含有するものが好適である。さらに、本発明の組成物としては、配列番号:2及び3、5及び6、8及び9、33及び34、36及び37、又は39及び40記載の塩基配列の組み合わせからなる核酸を含有する組成物、すなわち、配列番号:2の塩基配列を有する核酸と配列番号:3の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、配列番号:5の塩基配列を有する核酸と配列番号:6の塩基配列を有する核酸とを組

み合わせた核酸、

配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、及び

配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

からなる群より選択された少なくとも1種の核酸を含有した組成物が例示される。

[0041] 本発明の組成物に含まれる核酸は、好ましくは、デオキシリボヌクレオチド及び／又はリボヌクレオチドによって構成されるものが望ましい。また、当該核酸は、特に限定されないが、Flt3の機能を抑制する作用を有するものであればよく、一本鎖核酸であってもよく、二本鎖核酸であってもよい。また、本発明の組成物に含まれる核酸は、特に限定されないが、2'-ACE (2'-bis (acetoxymethoxy)-methylether) 又は2'-TBDMS (2'-t-butyl dimethylsilyl) 等の保護基を用いた化学合成法により合成することができる。

[0042] 化学合成法により合成された核酸は、特に限定は無いが、安定化や標識化のために、化学修飾基により修飾してもよい。本発明に使用できる修飾には特に限定は無いが、例えば、6-フルオレセイン付加、ビオチン付加、2'-O-メチル化、PNA (Peptide Nucleic Acid) 化、アミノ化等が挙げられる。当該修飾基は、RNA干渉作用を阻害しない限り、5'末端、3'末端あるいは内部塩基のいずれに付加してもよい。

[0043] 本発明の組成物の別の側面としては、ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制する核酸を保持したベクターを含有した組成物に関する。

[0044] さらに本発明の別の側面としては、前記核酸、例えば、下記(a)-(c):

(a) 配列番号:27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

(b) 配列番号:28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び

(c) 配列番号:29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、

からなる群より選択された領域を標的とし、かつ哺乳動物細胞内でFlt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有した組成物、具体的には、例えば、配列番号:1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応し、かつ該塩基配列に対応するRNAを発現しうる核酸を保持したベクターを含有した組成物、さらに具体的には、例えば、配列番号:2の塩基配列を有する核酸と配列番号:3の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:5の塩基配列を有する核酸と配列番号:6の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、及び

配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

からなる群より選ばれた核酸を保持したベクターを含有した組成物に関する。

[0045] 本発明の組成物によれば、ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域、又は前記(a)ー(c)からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、かつFlt3の機能を抑制する核酸を保持し発現させうるベクターを含有しているため、前記核酸による効果を発揮させ、前記細胞において、前記Flt3の機能を抑制する核酸を発現させ、前記細胞において、Flt3をコードする核酸の変異に基づく事象を抑制することができる。なお、標的領域は、1種の領域であってもよく、複数種の領域であってもよい。

[0046] 本発明の組成物に含まれるベクターは、哺乳動物細胞内でFlt3の機能を抑制する核酸を保持・発現させるためのベクターであり、当該細胞内で効率良く発現できるものであれば、骨格となるベクターは、特に限定されるものではない。前記骨格となるベクターとしては、特に限定はないが、例えば、プラスミドベクターや、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等のウイルスベクターが挙げられる。前記プラスミドベクターとしては、特に限定されないが、例えばRNA干渉用の核酸を発現させるpiGENE tRNAプラスミド(商品名、iGENE社製)、siLentGene(商品名、Promega社製)、pSEC Hygro Vector(商品名、Ambion社製)等が挙げられる。前記アデノウイルスベクターとしては、BD Knockout Adenoviral RNAi System(商品名、Becton Dickinson社製)が挙げられる。レトロウイルスベクターとしては、pSIREN-RetroQ Vector(商品名、Becton Dickinson社製)等が挙げられる。

[0047] 本発明の組成物に含有されるベクターに用いるプロモーターとしては、哺乳動物細胞内で機能しうるものであれば特に限定はなく、例えば、RNAポリメラーゼIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、テトラサイクリンで調節可能なプロモーター等が挙げられる。また、組織特異的プロモーターを用いることにより、所望の部位、臓器等においてFlt3の機能を抑制する核酸の発現が可能となる点で有利である。特に限定は無いが、例えば、前記RNAポリメラーゼIIプロモーターとしては、CMVプロモーター等が挙げられる。また、前記RNAポリメラーゼIII系プロモーターとしては、tRNAプロモーター、U6snRNAプロモーター、ヒストンH1プロモーター等が挙げられる。前記テトラサイクリンで調節可能なプロモーターとしては、テトラサイクリン調節型U6プロモーター、TRプロモーター等が挙げられる。また、上記プロモーターをCre-loxPシステムと組み合わせることにより、より厳密に発現を制御することもできる。

[0048] 当該ベクターは、例えば前記Flt3の機能を抑制する核酸を(I)2次構造予測のステップ、及び(II)siRNA配列選定のステップで構築し、当該核酸を得、適切なベクターに保持・発現可能に組み込むことにより構築されうる。

[0049] 前記ベクターの構築は、特に限定されないが、例えば、RNA干渉の場合(A)異な

る2つのプロモーター制御下に、前記核酸に関するセンスRNAをコードする核酸とアンチセンスRNAをコードする核酸とをそれぞれ順方向に配置して、別個にセンスRNAとアンチセンスRNAとを転写するタンデムタイプとして、(B) 1つのプロモーター制御下に本発明のRNA干渉剤に関するセンスRNAをコードする核酸とアンチセンスRNAをコードする核酸とをそれぞれ逆方向に配置して、センスRNAとアンチセンスRNAとがそれぞれループで連結されたステムループタイプ(又はヘアピンタイプ)のRNAを転写するタイプとして、あるいは、(C) ベクターのセンス鎖にて機能するプロモーター制御下に一方のRNAをコードする核酸を、アンチセンス鎖にて機能するプロモーター制御下に該RNAに相補的なRNAをコードする核酸を配置して、それぞれ別個のプロモーター制御下でそれぞれのRNAを転写する対向タイプとして、構築することにより行われうる。本発明のRNA干渉ベクターにおいては、特に限定されないが、好ましくは、反応条件、例えば、哺乳動物細胞の種類、センス配列とアンチセンス配列の種類等に応じ、タンデムタイプ、ステムループタイプ、対向タイプを使い分けることが望ましい。

- [0050] なお、前記ベクターにおいて、Flt3の機能を抑制しうる核酸の塩基配列は、配列特異的抑制作用、例えばRNAi干渉作用を示す配列であれば特に限定されないが、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを用いる場合、好ましくは、以下の2つの条件：
- － 転写開始点は、プリン残基[グアニル酸残基(G)又はアデニル酸残基(A)]とすること、及び
  - － アンチセンス鎖の3'末端に連続した4個のウラシル残基が付加されるため、転写開始点の前2塩基はAAとすること、
- を満たすことが望ましい。また、RNAポリメラーゼIIプロモーターを用いる場合、好ましくは、
- － ステムループタイプにすること、及び
  - － 短いポリ(A)配列を付加すること
- が望ましい。

- [0051] 以下にFlt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターの作製方法について、RNA干渉用のベクターの場合について説明する。

[0052] すなわち、Flt3の場合、例えば膜近傍領域、ATP結合領域及びキナーゼ活性領域について、前記のようにsiRNA配列を選択し、該siRNAが転写されるようにベクターを構築する。一方、siRNA転写に用いる発現ベクター、すなわち、本発明の組成物は、転写によりsiRNAを生じる配列をPCR法で作製し、U6 RNAポリメラーゼプロモーター(すなわち、U6プロモーター)の下流に挿入して、発現カセットを作製し、得られた発現カセットを適切なベクターの骨格に連結すること、あるいは、転写によりsiRNAを生じるDNAを化学合成し、制限酵素の認識配列のタグを付加し、得られた産物を、ベクターに挿入することにより得られうる。次に、得られたベクターを含む組成物を、エレクトロポレーション法やリポフェクション法によって、目的mRNA発現細胞にトランスフェクションすること、又は標的遺伝子を共トランスフェクションすることで、目的mRNAの発現抑制をスクリーニングする。一方、細胞へのトランスフェクション効率を改善する観点からは、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスベクターに発現カセットを挿入したベクターが本発明の組成物として利用できる。

[0053] このように本発明の組成物は、Flt3の機能を抑制しうる核酸又は当該核酸を保持したベクターを含有する組成物であり、さらに薬学的に許容される公知の担体と組み合わせることで調製することができ、また、その使用目的に応じて製剤化することもできる。例えば、注射剤、点滴用剤のような医薬組成物としてもよい。さらに、前記有効成分の安定化や細胞への導入のための成分を含有する組成物も本発明の組成物に包含される。なお、医薬組成物としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及び投与される患者の年齢、体重、症状に応じて適宜設定される。

[0054] (2) 本発明の組成物を用いたFlt3高発現細胞のアポトーシス誘発方法

本発明は、別の側面では、本発明の組成物を用いたFlt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させる、アポトーシス誘発方法に関する。

[0055] 具体的には、本発明のアポトーシス誘発方法は、1つの実施態様では、本発明の組成物により、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることを特徴とする、アポトーシス誘発方法に関する。

- [0056] 本発明のアポトーシス誘発方法は、本発明の組成物が用いられているため、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を優先的に抑制し、前記細胞のアポトーシスを誘発させることができる。
- [0057] また、本発明のアポトーシス誘発方法は、キナーゼを阻害する薬剤を用いる方法をさらに組み合わせてもよい。前記キナーゼを阻害する薬剤としては、好ましくは、チロシンキナーゼを阻害する薬剤、より好ましくは、Flt3キナーゼを阻害する薬剤が挙げられる。前記キナーゼを阻害する薬剤は、特に限定されないが、例えば、インドカルバゾール系誘導体CEP-701(セファロン社製)、キナゾリン系化合物CT53518(ミレニウム ファーマシューティカル社製)、スタウロスポリン誘導体PKC412(CGP41251、ノバルティス社製)、インドリノン系化合物SU11248(スージェン社製)、メタノン誘導体D-64406、D-65476(ASTAメディカ社製)、AG1295(CALBIOCHEM社製)等が挙げられる。
- [0058] すなわち、前記キナーゼを阻害する薬剤は、本発明の組成物との相乗効果により、Flt3キナーゼの発現を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発できるものであれば、いずれもが好適に使用できる。
- [0059] 本発明のアポトーシス誘発方法によれば、具体的には、本発明の組成物を、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞に導入し、それにより該細胞の増殖を選択的に抑制するステップを行ない、それにより、該細胞のアポトーシスを誘発させることができる。
- [0060] Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、具体的にはFlt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、より具体的には Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞への本発明の組成物の導入は、公知の遺伝子導入方法を用いることができる。特に限定するものではないが、例えば、エレクトロポレーション法、組織内注射、ハイドロダイナミクス法、マイクロイン

ジェクション、トランスフェクション、リポフェクション法、金粒子を用いたボンバードメント法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、ミセル粒子を用いる方法、逆ミセル粒子を用いる方法、低密度リポタンパク質を用いる方法、トランスフェリンを用いる方法、アテロコラーゲンを用いる方法、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いる方法、膜透過性ペプチドを用いる方法、膜融合性ペプチドを用いる方法等により行われうる。

- [0061] また、前記キナーゼを阻害する薬剤を用いる場合、同時にあるいはいずれか一方の使用後に他方を使用し、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることができる。
- [0062] Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞の増殖の抑制は、公知の遺伝子増幅方法、核酸ハイブリダイゼーション法、抗体を用いる方法等を用いて評価することができる。特に限定するものではないが、例えば、RT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、ELISA、免疫染色法等により行われうる。
- [0063] Flt3高発現細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有細胞のアポトーシスは、公知の方法を用いて評価することができる。特に限定するものではないが、例えば、当該細胞の形態変化の観察、該細胞中におけるDNA断片化の検出、乳酸脱水素酵素等の細胞外への漏出の検出、TUNEL法、MTT法、ELISA、免疫染色等により行われうる。
- [0064] さらに、本発明のアポトーシス誘発方法は、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3/ITD変異含有白血病細胞を有する白血病患者の当該細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させることができ、上記Flt3遺伝子が関与する白血病の治療方法としても利用できる。
- [0065] 白血病の治療効果は、公知の方法を用いることができる。特に限定するものではないが、例えば、骨髄・末梢血中の白血球像の確認、白血球のRT-PCR法による確認、免疫染色による確認、ELISAによる確認等により評価されうる。
- [0066] (3) 前記アポトーシス誘発方法を行なうためのキット

本発明は、別の側面では、前記アポトーシス誘発方法を行なうためのキットに関する。

[0067] 本発明のキットによれば、本発明の組成物を含有しているため、前記アポトーシス誘発方法を効率よく行なうことができ、前記Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、例えば、Flt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、さらに例えば、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を優先的に抑制し、前記細胞のアポトーシスを誘発させることができる。

[0068] 本発明のキットには、本発明の組成物を安定化させる緩衝溶液をさらに含有してもよい。また、本発明のキットには、本発明の組成物を、公知の遺伝子導入方法、特に限定するものではないが、例えば、エレクトロポレーション法、組織内注射、ハイドロダイナミクス法、リポフェクタミン法、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法等に使用される試薬をさらに含有していてもよい。

[0069] また、本発明のキットには、Flt3の機能を抑制する核酸を保持したベクターから当該核酸を転写させるためのDNA依存型RNAポリメラーゼをさらに含有していてもよい。

[0070] 本発明の組成物又はキットを用いることにより、Flt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させることができる。

[0071] Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞、具体的にはFlt3高発現癌化細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有癌化細胞、より具体的にはFlt3高発現白血病細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有白血病細胞への本発明の組成物の導入は、公知の遺伝子導入方法を用いることができる。特に限定するものではないが、例えば、エレクトロポレーション法、組織内注射、ハイドロダイナミクス法、マイクロインジェクション、トランスフェクション、リポフェクション法、金粒子を用いたボンバードメント法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、ミセル粒子を用いる方法、逆ミセル粒子を用いる方法、低密度リポタンパク質を用いる方法、トランスフェリンを用いる方法、アテロコラーゲンを用いる方法、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター

、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いる方法、膜透過性ペプチドを用いる方法、膜融合性ペプチドを用いる方法等により行われうる。

[0072] 以下の実施例により、さらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に何ら限定されるものではない。

### 実施例 1

[0073] (1) Flt3の機能を抑制しうる核酸の合成と選択

Flt3配列のATP結合部位領域、キナーゼ領域(TK領域)又は膜近傍領域を標的としたFlt3の機能を抑制しうる核酸を含有する組成物の有効性を、HL-60細胞(Flt3WT(野生型)低発現細胞)、EoL-1細胞(Flt3WT(野生型)高発現細胞)及びMV4-11細胞(Flt3/ITD高発現細胞)を用いて検討した。

[0074] Flt3の機能を抑制しうる核酸として用いるsiRNAは、以下に示す配列を設計し、タカラバイオ社に製造を委託した。

[0075] ATP結合部位領域の標的配列を配列番号:1に示す。この標的配列に対するsiRNA1のセンス配列を配列番号:2に、アンチセンス配列を配列番号:3に示す。TK領域の標的配列を配列番号:4に示す。この標的配列に対するsiRNA2のセンス配列を配列番号:5に、アンチセンス配列を配列番号:6に示す。膜近傍領域(Flt3/JMD領域)の標的配列を配列番号:7に示す。この標的配列に対するsiRNA3のセンス配列を配列番号:8に、アンチセンス配列を配列番号:9に示す。

[0076] (2) 各細胞への遺伝子導入

HL-60細胞(Flt3WT(野生型)低発現細胞;ATCC CCL-240)、EoL-1細胞(Flt3WT(野生型)高発現細胞;ECACC 94042252)及びMV4-11細胞(Flt3/ITD高発現細胞;ATCC CRL-9591)の各細胞を、10体積% ウシ胎仔血清(FBS)を添加したRPMI1640培地(タカラバイオ社製)で、5体積% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で培養した。

[0077] 次に、細胞( $2 \times 10^5$ 細胞/ml)を、6ウェルプレート中で24時間予め培養し、細胞を回収し、該細胞を $1.5 \times 10^5$ 細胞/mlとなるようにOpti-MEM(商品名、Invitrogen社製)に懸濁し、得られた懸濁液に、終濃度200pmolとなるように合成siRNAを添加した。Oligofectamin(商品名、Invitrogen社製) 4  $\mu$ l/反応を用いて、商品

名:Oligofectaminに添付のInvitrogen社のプロトコールに従ってトランスフェクションを行なった。なお、コントロールとして、siRNA無添加で同様に操作した。また、siRNAによる非特異的影響を、BCR/ABLキメラ mRNAに対するsiRNAを用いて評価した。

[0078] BCR/ABLキメラ mRNAの標的配列を配列番号:10に示す。この標的配列に対するsiRNA4のセンス配列を配列番号:11に、アンチセンス配列を配列番号:12に示す。

[0079] (3)RNA干渉の確認

標的遺伝子のRNA干渉の確認は、以下のように、リアルタイムRT-PCR法によるmRNA量の変化を測定することによって行なった。

[0080] Oligofectamin(商品名、Invitrogen社製)を用いて、合成siRNAを各細胞にトランスフェクションした。24時間後、得られた細胞から、TRIzol™試薬(Invitrogen社製)を用いて、全RNAを抽出し、得られた産物を、DNaseI(タカラバイオ社製)により処理した。なお、トランスフェクション、全RNAの抽出及びDNaseIによる処理について、用いた試薬の製造者のプロトコールに従って行なった。

[0081] 得られたRNA 100ngを鋳型とし、配列番号:13の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号:14の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマー対(各20 pmol)とし、Real Time One Step RNA PCR Kit(商品名、タカラバイオ社製)を用いて、リアルタイムRT-PCR法を行なった。なお、リアルタイムRT-PCR法においては、SYBER Green I(タカラバイオ社製)に基づく蛍光の変動を、LightCycler(商品名、Roche社製)により測定した。配列番号:15及び16記載のプライマーを用いて同様にGAPDH mRNAを測定することにより、RNA量を標準化した。

[0082] PCR条件は、95℃で30秒のインキュベーションの後、95℃で1秒と60℃で10秒と72℃で30秒とを1サイクルとする40サイクルの反応を行なう条件とした。

[0083] 各siRNAによるFlt3 mRNA干渉の結果を以下の表1に示す。なお、表1において、合成siRNAを添加せず、トランスフェクションの各操作のみを行なった細胞の相対mRNA発現量(Flt3 mRNA/GAPDH mRNA)を100%とし、合成siRNAを用いることにより変化した相対mRNA発現量(Flt3 mRNA/GAPDH mRNA)

の抑制された割合(%)を算出し、表示した。

[0084] [表1]

表 1

細胞名	siRNA 1	siRNA 2	siRNA 3	siRNA 4
MV4-11 (ITD 変異高発現)	65% (1.6)	54% (1)	65% (1)	5%
EoL1 (WT 高発現)	41% (1)*	54% (1)	63% (1)	8%
HL60 (WT 低発現)	31%	46%	38%	7%

\*: EoL1でのRNA干渉効果を1としたときの抑制相対比

[0085] 表1に示されるように、siRNA1を用いた場合、ITD変異を有する細胞におけるFlt3 mRNA発現を、siRNAを用いない場合の65%抑制し、ITD変異がない(つまりWT)の細胞の場合のFlt3 mRNA発現の抑制率と比べ、抑制相対値で1.6倍以上Flt3 mRNA発現を選択的に抑制することがわかる。

[0086] 一方、siRNA3を用いた場合、ITD変異の有無にかかわらず、Flt3高発現細胞において、Flt3 mRNA発現を、siRNAを用いない場合の65%抑制し、Flt3低発現細胞に比較し、抑制相対値で1.6倍以上Flt3 mRNA発現を選択的に抑制することが示された。

[0087] なお、siRNA2を用いた場合、全ての細胞でFlt3 mRNA発現を抑制し、その効果は、siRNAを用いない場合の50%前後であった。以上のことから、本発明の組成物は、Flt3の機能を抑制することができることを確認した。

[0088] 一方、Flt3 mRNAとは関係ないsiRNA4では、Flt3 mRNA発現の抑制は起こらなかった。したがって、Flt3 mRNA発現の抑制において、配列特異性があることが確認された。

## 実施例 2

[0089] 本発明の組成物の細胞増殖及びアポトーシスへの影響について検討した。

[0090] 本発明の組成物(合成siRNA1-3)は、上記実施例1-(1)と同様のものを用いた。

[0091]  $2 \times 10^4$ 細胞／ウェルの濃度で96ウェルプレートに入れた細胞をRPMI培地(10体積% FBS含有)で培養した。各種合成siRNA(各10nM)でトランスフェクションし、20時間後、細胞増殖活性を、商品名:Premix WST1試薬(商品名、タカラバイオ社製)を用いて測定した。コントロール(siRNA無添加でトランスフェクション処理した場合)の増殖能に比較しての相対増殖能(%)を求めた。なお、実験は、各々n=3で実施し、その平均値を求めた。

[0092] また、全細胞中におけるアポトーシス細胞の比率を、アポトーシス検出ELISA試薬(Roche社製)を用い、添付のプロトコールにしたがって測定した。なお、実験は、各々n=3で実施し、その平均値を求めた。アポトーシスの検出は、siRNAを導入した後の細胞をPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)で洗浄し、 $5 \times 10^3$ 細胞から細胞ライゼートを得、該細胞ライゼートのサイトプラズミック画分をビオチン化抗ヒストン抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗DNA抗体と反応させるサンドイッチELISAを行なうことにより実施した。非結合抗体を洗浄後、ABTS発色試薬を添加し、405nmの吸光度を測定し、コントロール(siRNA無添加でトランスフェクション処理した場合)に対するアポトーシスの相対頻度を%で表した。

[0093] 各種合成siRNAによるFlt3 mRNA発現白血病細胞への増殖活性への影響の結果を表2に示す。

[0094] [表2]

表2

細胞名	siRNA 1	siRNA 2	siRNA 3
MV4-11	56.4%	41.4%	37.5%
(ITD 変異高発現)	(0.49)	(0.36)	(0.41)
EoL1	68.5%	79.7%	45.1%
(WT 高発現)	(0.60)	(0.70)	(0.50)
HL60	116%	115%	90.3%
(WT 低発現)	(1)*	(1)	(1)

\*: HL60でのRNA干渉効果を1としたときの細胞増殖活性比

[0095] 表2に示されるように、siRNA1〜3を用いた場合、各々Flt3 mRNA高発現細胞の増殖を選択的に抑制することが確認できた。また、siRNA3を用いた場合、ITD変異の有無に関係なく、IC50(50%阻止濃度) 10nMの濃度でFlt3 mRNA高発現細胞の増殖を抑制することが確認できた。

- [0096] さらに、siRNAを導入することによって増殖が60%以下に抑制された細胞では、40%以上の細胞でアポトーシスが起きていることが確認された。

### 実施例 3

- [0097] Flt3の機能を抑制しうる核酸を発現させるためのカセットは、BamHIサイト、loopサイト、RNA PolIII(RNAポリメラーゼIII)ターミネーターサイト及びHindIIIサイトを有するように設計され、タカラバイオ社により製造された。
- [0098] ATP結合部位領域に対するセンス配列を配列番号:17に、アンチセンス配列を配列番号:18に示す。また、対照として、上記siRNAとGC含量が同じであるカセットも作製した。センス配列を配列番号:19に、アンチセンス配列を配列番号:20に示す。
- [0099] Flt3/ITD領域に対するセンス配列を配列番号:21に、アンチセンス配列を配列番号:22に示す。また、対照として、上記siRNAとGC含量が同じであるカセットも作製した。センス配列を配列番号:23に、アンチセンス配列を配列番号:24に示す。
- [0100] 得られた合成DNAを、90℃で3分間加熱した。その後、直ちに37℃に冷却し、センス配列を有する核酸と対応するアンチセンス配列を有する核酸とを1時間インキュベーションし、アニーリングすることでFlt3の機能を抑制しうる核酸を発現させるためのカセットを作製した。
- [0101] 次に商品名:pSilencer 2.1 siRNA Expression Vector Kit(Human U6 Promotor、Hygromycin選択用;Ambion社製)を用いて、製造者のプロトコールにしたがって、Flt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを構築した。すなわち、前記アニーリングさせた該カセットを、T4DNAリガーゼを用いて、上記pSilencer Vectorに連結させ、Flt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを得た。得られたベクターを用いて、大腸菌コンピテントセル(DH5 $\alpha$ 、又はJM109)を形質転換し、37℃で1晩、Ampicillin含有LB培地上で培養し、形質転換されたコロニーを選択し、pSilencerプラスミドを精製した。なお、精製されたプラスミドを、BamHIとHindIIIとを用いて消化し、挿入断片の存在を指標として陽性クローンを確認した。また、陽性クローンのDNAについて、配列番号:25に示される塩基配列及び配列番号:26に示される塩基配列のそれぞれのシーケンシングプライマーを用いて解析し、pSilencerプラスミドの挿入断片の塩基配列を確認した。

## 実施例 4

### [0102] (1) Kinase inhibitorとの組み合わせの検討

本発明の組成物(合成siRNA3)とKinase inhibitorとの組み合わせによる処理によるMV4-11 (ITD変異)細胞の増殖阻害活性について検討した。合成siRNA3は、上記実施例1-(1)と同様のものを用いた。Kinase inhibitorとして、ITD変異細胞に対して特異性の高いAG1295(CALBIOCHEM社製)を用いた。

### [0103] (2) 細胞へのトランスフェクション

上記実施例1-(2)と同様に、RPMI1640培地(タカラバイオ社製)に10体積% ウシ胎仔血清(FBS)を添加して得られた培地(以下、culture mediumと称す)、5体積% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で24時間、MV4-11細胞を培養した。ついで、Opti-ME M(商品名、Invitrogen社製)で懸濁したMV4-11細胞( $1 \times 10^6$ 細胞/ml)をCuvvet(BIO RAD社製;間隙 4mm)に移し、該Cuvvetに、siRNA3を終濃度1.2  $\mu$ Mとなるように添加した。次に、このCuvvetを、Gene Pulser Xcell(商品名、BIO RAD社製)にセットした後、電場強度 650V/cm、25msecでPulseした。次に、Cuvvetに懸濁した細胞液量の4倍量のculture medium中に加えて懸濁し、96ウェルプレートに100  $\mu$ l/ウェルとなるように分注した。

[0104] なお、コントロールsiRNAとして、C3GFP(Green Fluorescent Proteinの変異体)の配列(センス配列:配列番号:30、アンチセンス配列:配列番号:31)を有するsiRNAを用い、同様に操作して実施した。

### [0105] (3) AG1295処理

4mM AG1295(DMSOにて溶解)を、前記culture mediumにて10  $\mu$ M、6  $\mu$ M及び0  $\mu$ M(0.25体積% DMSO)に調製した各濃度のAG1295を、上記(2)で用意した96ウェルプレートに100  $\mu$ l/ウェルとなるように添加し、5体積% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で培養した。培養開始後72時間目、Premix WST-1試薬(商品名、タカラバイオ社製)を用い、製造者のプロトコールに従って、細胞の増殖活性を測定した。なお、実験は各々n=6で実施し、その平均値を求めた。コントロールsiRNA/0  $\mu$ M AG1295でトランスフェクションした場合の増殖能に比較した相対増殖率(%)を求めた。結果を図1に示す。

- [0106] 図1において、横軸はAG1295濃度( $\mu$ M)、縦軸は相対増殖率(%)を示す。黒棒はコントロールsiRNAを、白棒はsiRNA3を用いた場合の結果を示す。
- [0107] 図1に示されるように、Kinase inhibitor単独での処理により、MV4-11 (ITD変異)細胞の増殖は、コントロールsiRNA/ $0 \mu$ M AG1295でトランスフェクションした場合と比べ、濃度依存的に、 $3.0 \mu$ M AG1295で59.8%、 $5.0 \mu$ M AG1295で84.3%抑制されることが確認できた。また、siRNA3単独で用いた場合、細胞の増殖は、コントロールsiRNA/ $0 \mu$ M AG1295でトランスフェクションした場合と比べ、83.7%抑制されることが確認できた。
- [0108] しかしながら、驚くべきことに、siRNA3とAG1295とを併用すると、細胞の増殖は、コントロールsiRNA/ $0 \mu$ M AG1295でトランスフェクションした場合と比べ、 $3.0 \mu$ M AG1295で94.5%、 $5.0 \mu$ M AG1295で99.7%と非常に高く抑制することが確認できた。
- [0109] このことにより、siRNA3単独の場合、あるいは当該組成物とAG1295等のレセプター型Kinase阻害剤と併用した場合のいずれにおいても、非常に高い増殖抑制効果を得ることができることが確認できた。

## 実施例 5

- [0110] (1) Flt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターによる細胞増殖効果
- 予め5体積%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$ で培養しておいたMV4-11細胞( $2 \times 10^6$ 細胞)をCuvvet (BIO RAD社製; 間隙 4mm)に移し、該Cuvvetに、実施例3で構築したFlt3/ITD領域を有するベクター  $3 \mu$ g、又はコントロールとして、Flt3/ITD領域とGC含量が同じであるベクター  $3 \mu$ gを添加した。次にこのCuvvetを、Gene Pulser Xcell (商品名、BIO RAD社製)にセットした後、電場強度  $650\text{V}/\text{cm}$ 、25msecでPulseした。次にCuvvetに懸濁した細胞液量の4倍量のculture medium中に加えて懸濁し、96ウェルプレートに $100 \mu$ l/ウェル分注し、5体積%  $\text{CO}_2$ 存在下、 $37^\circ\text{C}$ で細胞を培養した。培養開始24時間後、細胞の増殖活性を、Premix WST-1試薬(タカラバイオ社製)を用いて、添付の製造者のプロトコールに従い測定した。なお、実験は各々 $n=6$ で実施し、その平均値を求めた。MV4-11 (ITD変異高発現)細胞の増殖阻害活性をコントロールの増殖能に比較しての相対増殖率(%)を求

めた。結果を図2に示す。

- [0111] 図2に示されるように、MV4-11 (ITD変異高発現)細胞の増殖は、コントロールに比べ、71.4%抑制されることが確認できた。従って、前記実施例1-4における合成 siRNAと同様にFlt3/ITD領域を標的とするsiRNAにおいても、ITD変異高発現であるMV4-11を効率よく増殖抑制する効果を得られることが確認できた。

## 実施例 6

- [0112] (1)抗Flt3 siRNAの合成と選択

Flt3配列のATP結合部位領域、キナーゼ領域(TK領域)又は膜近傍領域を標的とした核酸としてのsiRNAの有効性を、HL-60細胞(Flt3WT低発現)、EoL-1細胞(Flt3WT高発現)及びMV4-11細胞(Flt3/ITD高発現)を用いて検討した。なお、本発明の組成物として用いるsiRNAも、タカラバイオ社で製造した。

本実施例においては、3'突出構造を有さないdsRNAについて検討した。

- [0113] ATP結合部位領域の標的配列を配列番号:32に示す。この標的配列に対するsiRNAのセンス配列を配列番号:33に、アンチセンス配列を配列番号:34に示す。TK領域の標的配列を配列番号:35に示す。この標的配列に対するsiRNAのセンス配列を配列番号:36に、アンチセンス配列を配列番号:37に示す。膜近傍領域(Flt3/JMD領域)の標的配列を配列番号:38に示す。この標的配列に対するsiRNAのセンス配列を配列番号:39に、アンチセンス配列を配列番号:40に示す。

- [0114] (2)各細胞への遺伝子導入

HL-60細胞、EoL-1細胞及びMV4-11細胞の各細胞は、10重量% ウシ胎仔血清(FBS)を添加したRPMI1640培地(タカラバイオ社製)で、5体積% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で24時間培養した。

- [0115] 該細胞を $1.5 \times 10^6$ 細胞/mlとなるようにOpti-MEM(商品名、Invitrogen社製)に懸濁し、得られた懸濁液をCuvvet(BIO RAD社製;間隙 4mm)に移し、該Cuvvetに合成したsiRNAをそれぞれ終濃度 $1.2 \mu\text{M}$ となるように添加した。

- [0116] 次に、このCuvvetをGene Pulser Xcell(商品名、BIO RAD社製)にセットした後、電場強度 650V/cm、25msecでPulseした。次に、Cuvvetに懸濁した細胞液量の4倍量のculture medium中に加えて懸濁し、96ウェルプレートに100  $\mu\text{l}$ /

ウェルとなるように分注した。

- [0117] なお、コントロールsiRNAとしてはC3GFP (Green Fluorescent Proteinの変異体)の配列(センス配列:配列番号:30、アンチセンス配列:配列番号:31)を有するsiRNAを用い、同様に操作して実施した。

[0118] (3)RNA干渉の確認

標的遺伝子のRNA干渉の確認は、以下のように、リアルタイムRT-PCR法によるmRNA量によって行なった。すなわち、合成siRNAを各細胞にトランスフェクションした。17時間後、前記細胞から、TRIzol<sup>TM</sup>試薬 (Invitrogen社製)を用いて、全RNAを抽出した。その後、得られた全RNAをDNaseI (タカラバイオ社製)により処理した。トランスフェクション、全RNAの抽出及びDNaseIによる処理について、各々、製造者のプロトコールに従って行なった。

- [0119] 得られたRNA 100ngを鋳型とし、配列番号:13の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号:14の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマー対(各20 pmol)とし、Real Time One Step RNA PCR Kit (商品名、タカラバイオ社製)を用いて、リアルタイムRT-PCR法を行なった。なお、リアルタイムRT-PCR法においては、SYBER Green I (タカラバイオ社製)に基づく蛍光の変動を、LightCycler (商品名、Roche社製)により測定した。配列番号:15及び16記載のプライマーを用いて同様にGAPDH mRNAを測定することにより、RNA量を標準化した。

- [0120] PCR条件は、95℃で30秒のインキュベーションの後、95℃で1秒と60℃で10秒と72℃で30秒とを1サイクルとする40サイクルの反応を行なう条件とした。

- [0121] その結果、Flt3の機能を抑制しうる核酸において3'末端に突出しているTT配列を含まない配列である核酸でもITD変異を有する細胞で発現したFlt3 mRNAを抑制し、ITD変異がない(つまりWT)の細胞と比較して選択的に抑制することが確認できた。

実施例7

[0122] (1)合成siRNAの細胞増殖への影響

本発明の組成物として合成siRNA1、2、3を含有するカクテル及びsiRNA3単独によるMV4-11 (ITD変異)細胞の増殖阻害活性について検討した。合成siRNA1

、2及び3は上記実施例1-(1)と同様のものを用いた。

[0123] (2)細胞へのTransfection

MV4-11細胞の培地は上記実施例1-(2)と同様のものを用い、RPMI1640培地(タカラバイオ社製)に10体積% 牛胎児血清(FBS)を加えた培地(以下、culture mediumと称す)、5体積%  $\text{CO}_2$  存在下、37℃で24時間培養した。次に合成siRNA3のトランスフェクションは、以下のように行った。Opti-MEM(invitrogen社製)で懸濁したMV4-11細胞( $2 \times 10^6$ 細胞/ml)をCuvvet(BIO RAD社製;間隙 4 mm)に移し、これに合成したsiRNA1、2及び3を等量モル加えたsiRNAカクテル及びsiRNA3単独をそれぞれ終濃度1.2  $\mu\text{M}$ となるように添加した。次にこのCuvvetをGene Pulser Xcell(BIO RAD社製)にセットした後、電場強度 650V/cm、25msecでPulseした。次に、Cuvvetに懸濁した細胞液量の4倍量のculture medium中に加えて懸濁し、96ウェルプレートに100  $\mu\text{l}$ /ウェルとなるように分注した。

[0124] なお、コントロールsiRNAとしてはC3GFP(Green Fluorescent Proteinの変異体)の配列(センス配列:配列表の配列番号30、アンチセンス配列:配列表の配列番号31)を有するsiRNAを同様に操作して実施した。

[0125] (3)細胞増殖測定

上記(2)で用意した96ウェルプレートに100  $\mu\text{l}$ /ウェル加え5体積%  $\text{CO}_2$  存在下、37℃で培養した。培養開始後72時間目に細胞の増殖活性をPremix WST-1試薬(タカラバイオ社製)でメーカーのプロトコールに従い測定した。なお、実験は各々n=6で実施し、その平均値を求めた。コントロールsiRNAでTransfectionの増殖能に比較しての相対増殖率(%)を求めた。結果を図3に示す。

[0126] 図3に示したように、siRNA3単独では46.5%増殖抑制することが示されたが、siRNAカクテルでは23.0%と非常に高い増殖抑制することが示された。このことにより、siRNA3単独でも十分な増殖抑制効果を得ることでき、さらにsiRNAを含有するカクテルで用いることにより非常に高い増殖抑制効果を得ることができることが確認できた。

産業上の利用可能性

[0127] 本発明により、ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域、あるいはATP結合部位領域

から選択された領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸あるいは該核酸を保持したベクターを含有してなる、組成物が提供される。当該組成物は、Flt3高発現細胞及び／又はFlt3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、アポトーシスを誘発させる方法に使用することができる。さらに、当該方法のためのキットが提供される。本発明の組成物は、白血病患者の治療剤として用いることができる。

#### 配列表フリーテキスト

- [0128] 配列番号:1は、ATP結合部位領域の部分cDNA配列である。
- [0129] 配列番号:2は、SEQ1-Sと称す。ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0130] 配列番号:3は、SEQ1-ASと称す。ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0131] 配列番号:4は、TKドメインの部分cDNA配列である。
- [0132] 配列番号:5は、SEQ2-Sと称す。ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0133] 配列番号:6は、SEQ2-ASと称す。ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0134] 配列番号:7は、Flt3／ITDドメインの部分cDNA配列である。
- [0135] 配列番号:8は、SEQ3-Sと称す。ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0136] 配列番号:9は、SEQ3-ASと称す。ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0137] 配列番号:10は、bcr／ablキメラドメインの部分cDNA配列である。
- [0138] 配列番号:11において、ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0139] 配列番号:12において、ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。
- [0140] 配列番号:13は、Flt3をコードする遺伝子を増幅するためのPCRプライマーFlt11Fである。

- [0141] 配列番号:14は、Flt3をコードする遺伝子を増幅するためのPCRプライマーFlt12Rである。
- [0142] 配列番号:15は、GAPDHをコードする遺伝子を増幅するためのPCRプライマーG1である。
- [0143] 配列番号:16は、GAPDHをコードする遺伝子を増幅するためのPCRプライマーG2である。
- [0144] 配列番号:17は、ATP結合ドメインに対するsiRNAを発現させるための発現カセットFlt3SI1Fである。ヌクレオチド1-5の領域は、BamHI制限酵素部位、ヌクレオチド26-34の領域は、ループ部位、ヌクレオチド54-59の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位である。
- [0145] 配列番号:18は、ATP結合ドメインに対するsiRNAを発現させるための発現カセットFlt3SI1Rである。ヌクレオチド1-5の領域は、HindIII制限酵素部位、ヌクレオチド10-15の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位、ヌクレオチド35-43の領域は、ループである。
- [0146] 配列番号:19は、コントロール配列のための発現カセットFlt3CON1Fである。ヌクレオチド1-5の領域は、BamHI制限酵素部位、ヌクレオチド26-34の領域は、ループ部位、ヌクレオチド54-59の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位である。
- [0147] 配列番号:20は、コントロール配列の発現のための発現カセットFlt3CON1Rである。ヌクレオチド1-5の領域は、HindIII制限酵素部位、ヌクレオチド10-15の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位、ヌクレオチド35-43の領域は、ループ部位である。
- [0148] 配列番号:21は、Flt3/ITDドメインに対するsiRNAの発現のための発現カセットFlt3SI3Fである。ヌクレオチド1-5の領域は、BamHI制限酵素部位、ヌクレオチド26-34の領域は、ループ部位、ヌクレオチド54-59の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位である。
- [0149] 配列番号:22は、Flt3/ITDドメインに対するsiRNAの発現のための発現カセットFlt3SI3Rである。ヌクレオチド1-5の領域は、HindIII制限酵素部位、ヌクレオチド1

0-15の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位、ヌクレオチド35-43の領域は、ループ部位である。

[0150] 配列番号:23は、コントロール配列の発現のための発現カセットFlt3CON3Fである。ヌクレオチド1-5の領域は、BamHI制限酵素部位、ヌクレオチド26-34の領域は、ループ部位、ヌクレオチド54-59の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位である。

[0151] 配列番号:24は、コントロール配列の発現のための発現カセットFlt3CON3R である。ヌクレオチド1-5の領域は、HindIII制限酵素部位、ヌクレオチド10-15の領域は、RNAポリメラーゼIIIターミネーター部位、ヌクレオチド35-43の領域は、ループ部位である。

[0152] 配列番号:25は、5'シーケンシングプライマーである。

[0153] 配列番号:26は、3'シーケンシングプライマーである。

[0154] 配列番号:27は、膜近傍部位ドメインである。

[0155] 配列番号:28は、チロシンキナーゼドメインである。

[0156] 配列番号:29は、ATP結合ドメインである。

[0157] 配列番号:30において、ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。

[0158] 配列番号:31において、ヌクレオチド20及び21は、デオキシリボヌクレオチド、他のヌクレオチドは、リボヌクレオチドである。

[0159] 配列番号:32は、ATP結合部位の部分cDNA配列である。

[0160] 配列番号:33は、siRNAである。

[0161] 配列番号:34は、siRNAである。

[0162] 配列番号:35は、TKドメインの部分cDNA配列である。

[0163] 配列番号:36は、siRNAである。

[0164] 配列番号:37は、siRNAである。

[0165] 配列番号:38は、Flt3/ITDドメインの部分cDNA配列である。

[0166] 配列番号:39は、siRNAである。

[0167] 配列番号:40は、siRNAである。

## 請求の範囲

- [1] ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を含有してなる、組成物。
- [2] 下記(a)ー(c):
- (a) 配列番号:27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、
- (b) 配列番号:28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び
- (c) 配列番号:29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、
- からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を含有してなる、組成物。
- [3] 15ー25塩基の鎖長を有する核酸を含有してなる、請求項1又は2記載の組成物。
- [4] 配列番号:1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応するRNA配列を含有してなる、請求項1又は2記載の組成物。
- [5] 配列番号:2の塩基配列を有する核酸と配列番号:3の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:5の塩基配列を有する核酸と配列番号:6の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、及び
- 配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

からなる群より選択された核酸を含有してなる、請求項1〜4のいずれか1項に記載の組成物。

- [6] ヒトFlt3の膜近傍領域、キナーゼ領域及びATP結合部位領域からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、Flt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、組成物。
- [7] 下記(a)〜(c):
- (a)配列番号:27記載のヒト正常型Flt3の膜近傍領域のcDNA塩基配列に対応する領域、
- (b)配列番号:28記載のヒト正常型Flt3のキナーゼ領域のcDNA塩基配列に対応する領域、及び
- (c)配列番号:29記載のヒト正常型Flt3のATP結合部位領域のcDNA塩基配列に対応する領域、
- からなる群より選択された少なくとも1種の領域を標的とし、かつ哺乳動物細胞内でFlt3の機能を抑制しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、組成物。
- [8] 該核酸が、標的領域の15〜25塩基の塩基配列を有する、請求項6又は7記載の組成物。
- [9] 配列番号:1、4、7、32、35及び38からなる群より選ばれた少なくとも1種の塩基配列に対応し、かつ該塩基配列に対応するRNAを発現しうる核酸を保持したベクターを含有してなる、請求項6又は7記載の組成物。
- [10] 該核酸が、配列番号:2の塩基配列を有する核酸と配列番号:3の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:5の塩基配列を有する核酸と配列番号:6の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:8の塩基配列を有する核酸と配列番号:9の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:33の塩基配列を有する核酸と配列番号:34の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、
- 配列番号:36の塩基配列を有する核酸と配列番号:37の塩基配列を有する核酸とを

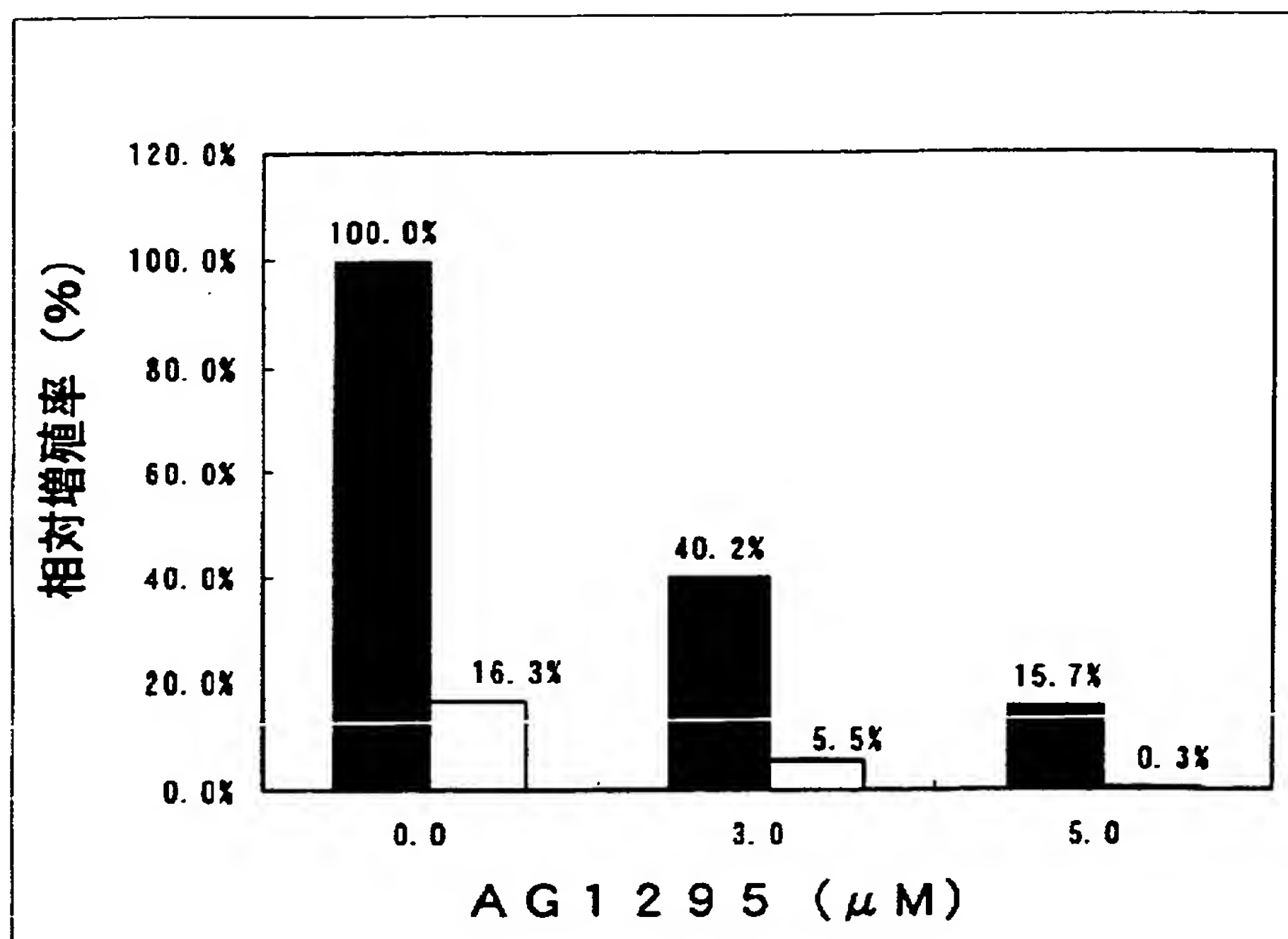
組み合わせた核酸、及び

配列番号:39の塩基配列を有する核酸と配列番号:40の塩基配列を有する核酸とを組み合わせた核酸、

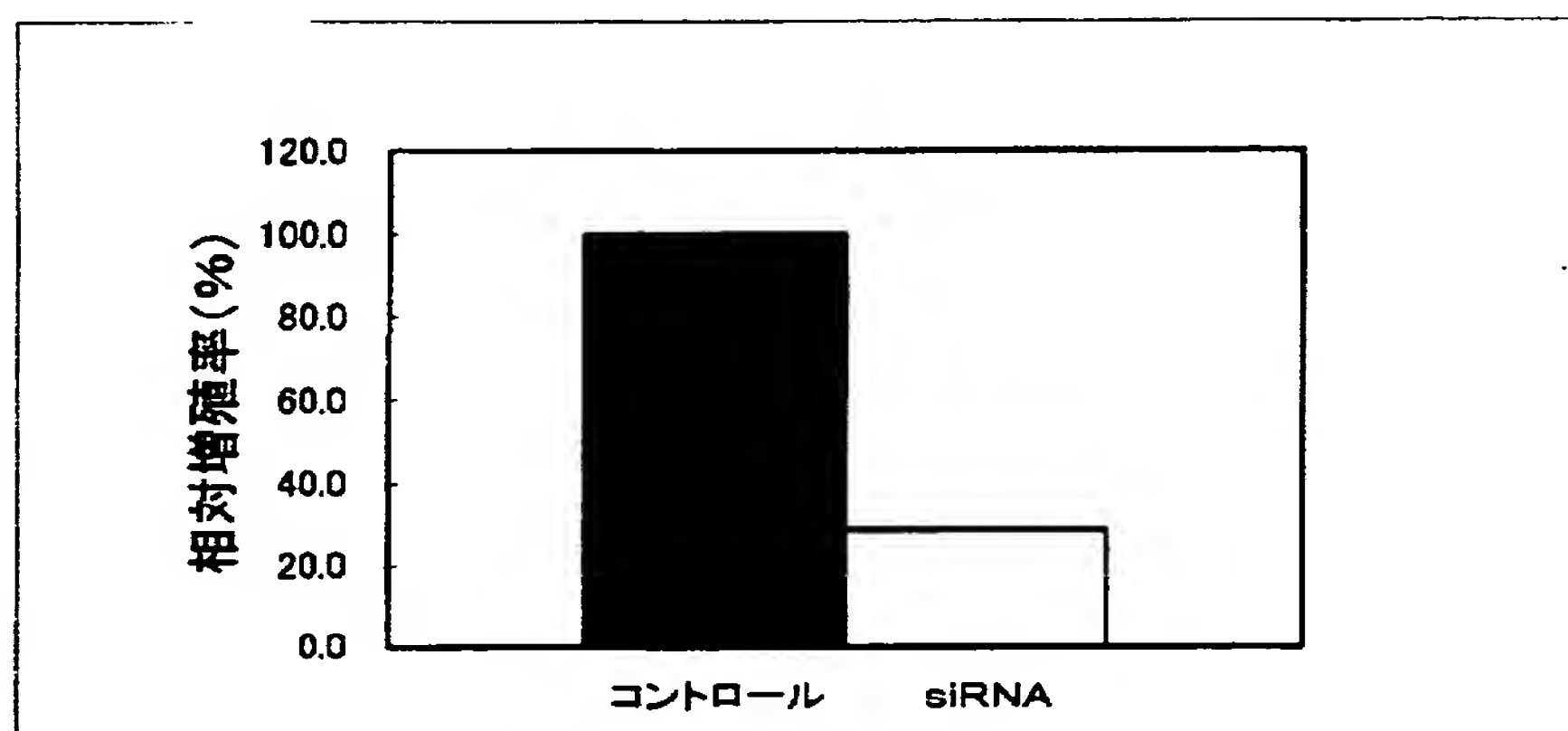
からなる群より選ばれた核酸を保持したベクターを含有してなる、請求項6〜9のいずれか1項に記載の組成物。

- [11] プロモーターとして、RNAポリメラーゼIIIプロモーター又はRNAポリメラーゼIIプロモーターを有するベクターを含有してなる、請求項6〜10のいずれか1項に記載の組成物。
- [12] 該プロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーター及びCMVプロモーターからなる群より選択されたプロモーターである、請求項11記載の組成物。
- [13] アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター及びレトロウイルスベクターから選択されたベクターを基本骨格として含有してなる、請求項6〜12のいずれか1項に記載の組成物。
- [14] 請求項1〜13のいずれか1項に記載の組成物により、FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることを特徴とする、アポトーシス誘発方法。
- [15] キナーゼを阻害する薬剤をさらに用いて、同時に或いはいずれか一方の使用後に他方を使用し、FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞の増殖を選択的に抑制し、それにより、該FLT3高発現細胞及び／又はFLT3／ITD変異含有細胞のアポトーシスを誘発させることを特徴とする、請求項14記載の方法。
- [16] 請求項1〜13のいずれか1項に記載の組成物を含有してなる、請求項14又は15記載の方法を行なうためのキット。

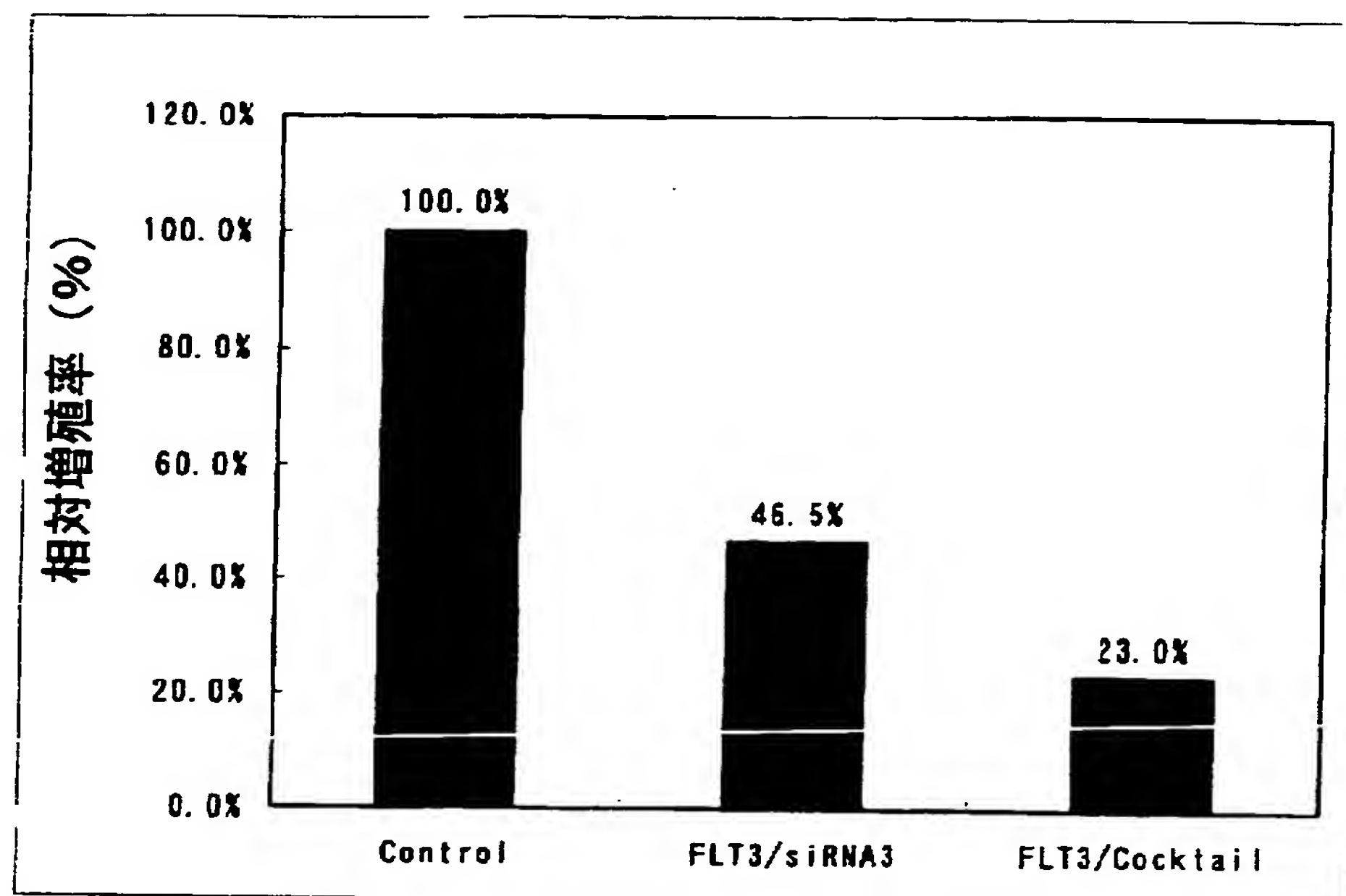
[図1]



[図2]



[図3]



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K48/00, 31/7088, 35/76, A61P35/00, 43/00, 35/02, C12N15/09		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K48/00, 31/7088, 35/76, A61P35/00, 43/00, 35/02, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ROSNET O. et al., Human FLT3/FLK2 Gene:cDNA Cloning and Expression in Hematopoietic Cells., Blood, 1993 Aug 15, 82 (4), p.1110-1119	1-13, 16
Y	WO 2000/11470 A1 (中外製薬株式会社), 2000.03.02, 特に、特許請求の範囲、第1頁第11行~第3頁第10行及び第9頁第25行~第10頁第11行 & EP 1109020 A1	1-13, 16
Y	YEE Kevin W H et al., SU5416 and SU5614 inhibit kinase activ	1-13,
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
<p>* 引用文献のカテゴリ</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日 04.01.2005	国際調査報告の発送日 25.1.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 のぶよ	4C 9454
電話番号 03-3581-1101 内線 3451		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	ity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. , Blood, 2002 Oct 15, 100 (8), p.2941-9	1 6
Y	YAMAMOTO Y et al., Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. , Blood, 2001 Apr 15, 97 (8), p.2434-9	1-1 3, 1 6
Y	FIRE A. et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i> . , Nature, 1998 Feb 19, Vol.391, p.806-811	1-1 3, 1 6
Y	DYKXHOORN D. M. et al., Killing the messenger: short RNAs that silence gene wxpression. , Nature Rev. Mol. Cell Biol., 2003 June, Vol.4, p.457-467	1-1 3, 1 6
Y	ELBASHIR S. M. et al, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. , Nature, 2001 May 24, Vol.411, p.494-498	1-1 3, 1 6
Y	HEIDENREICH O. et al., AML1/MTG8 oncogene suppression by small interefering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. , Blood, 2003 Apr 15, 101 (8), p.3157-3163	1-1 3, 1 6
Y	MARTINEZ L. A. et al., Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002 Nov 12, Vol.99, p.14849-14854	1-1 3, 1 6
Y	WILDA M. et al., Killing of leukemic cells with a <i>BCR/ABL</i> fusion gene by RNA interference(RNAi). , Oncogene, 2002, Vol.21, p.5716-5724	1-1 3, 1 6
Y	SCHERR M. et al., Specific inhibition of <i>bcr-abl</i> gene expression by small interfering RNA. , Blood, 2003 Feb 15, 101 (4), p.1566-1569	1-1 3, 1 6
Y	WOHLBOLD L. et al., Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imantinib mesylate(STI571). , Blood, 2003 Sep 15, 102 (6), p.2236-2239	1-1 3, 1 6
Y	SHEN C. et al., Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. , FEBS Letters, 2002 Mar 27, Vol.539, p.111-114	1-1 3, 1 6

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14, 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲14, 15は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。